

**BEST AVAILABLE COPY**

Aplus Answer Number 1 - © 1999 ACS  
Find documents citing this reference [\$2.00]  
Title

Preparation of stress-resistant rice plants by introducing the kinase-encoding gene of *Rhizopus*  
*oryzosporus*  
Inventor Name

Tada, Toru; Kanzaki, Hiroshi; Takagi, Masamichi; Nakamura, Ikuo  
Patent Assignee

Iwate Prefecture, Japan  
Publication Source

Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 8 pp.  
Identifier-CODEN

JKXXAF  
Patent Information

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
------------	------	------	-----------------	------

JP 10286034A219981027JP 97-9713819970415

Abstract

Described is a method for the prepn. of transgenic rice resistant to stress by introducing the gene encoding kinase of *Rhizopus*  
*oryzosporus* into the callus of rice embryos, followed by cultivating the callus to obtain fully grown rice plants. The kinase gene was carried on plasmid pUbi-CHI and its expression is regulated by the promoter of corn ubiquitin gene.

International Patent Classification  
International Patent Classification, Main

A01H005-00  
International Patent Classification, Secondary

C12N005-10; C12N015-09  
Document Type

Patent  
Language

Japanese  
Accession Number

1998:692892

Reference Number

130:11264

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-286034

(43) 公開日 平成10年(1998)10月27日

(51) IntCl.<sup>8</sup> 識別記号  
A 0 1 H 5/00  
C 1 2 N 5/10  
// C 1 2 N 15/09

F I  
A 0 1 H 5/00 A  
C 1 2 N 5/00 C  
15/00 A

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-97138

(22) 出願日 平成9年(1997)4月15日

特許法第30条第1項適用申請有り 1997年1月12日~1月16日 開催の「The international Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research」において文書をもって発表

(71) 出願人 390025793

岩手県

岩手県盛岡市内丸10番1号

(72) 発明者 多田 徹

岩手県和賀郡東和町安俣10地割151番地

(72) 発明者 神崎 洋之

岩手県北上市村崎野16地割166番地1 プリンセス201

(72) 発明者 高木 正道

東京都府中市栄町1丁目31番10号

(72) 発明者 中村 郁郎

岩手県花巻市下幅24地割51番地

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 遺伝子導入イネの作出方法及び該方法により作出されたイネ

(57) 【要約】

【解決手段】 イネに外来性キチナーゼ遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入イネの作出方法、及び該方法により作出されたイネ。

【効果】 キチナーゼ遺伝子を導入したイネを効率良く作出できる方法を提供する。また、この方法により作出されるイネは、いもち病等の各種病害に対して抵抗性を有する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネに外来性キチナーゼ遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入イネの作出方法。

【請求項2】 外来性キチナーゼ遺伝子が、リゾプス・オリゴスポラス由来のキチナーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする請求項1記載の遺伝子導入イネの作出方法。

【請求項3】 キチナーゼ遺伝子の導入が、キチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAをイネの胚様体カルス of 分裂細胞に導入することを特徴とする請求項1又は2記載の遺伝子導入イネの作出方法。

【請求項4】 請求項1乃至3のいずれか一の請求項に記載された方法により作出された遺伝子導入イネ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子導入イネの作出方法及び該方法により作出されたイネに関し、詳細にはキチナーゼ遺伝子を導入することにより植物病害等へのストレス抵抗性を増強させたイネの作出方法及び該方法により作出されたイネに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子工学技術を用いて植物に有用遺伝子を導入し、植物病害に強い病害耐性植物を作出する試みが進められている。例えば、植物病原菌に対する防御機構の強化を目的として、キチナーゼ遺伝子の植物への導入が試みられている。植物に病害を引き起こす種々の糸状菌が知られているが、糸状菌は、その細胞壁を構成する主要成分の一つとしてキチンを有している。一方、植物はキチンを分解する酵素、キチナーゼ (EC3.2.1.14) を有しており、これが植物に感染しようとする糸状菌の細胞壁中のキチンに作用して、これらの病原菌による感染・発病を防止する防御機構となっていると考えられる。

【0003】上記のような防御機構に着目し、種々の生物に由来するキチナーゼ遺伝子を植物に導入することによって、耐病性が強化された遺伝子組換え植物が作出されている。

【0004】例えば、①細菌セラチア・マルセスンス (*Serratia marcescens*) から単離されたキチナーゼ遺伝子をタバコに導入したもの (Mol. Gen. Genet. 210: 572-577 (1987))、②インゲンマメから単離したキチナーゼ遺伝子をタバコに導入したもの (The Plant Cell 1: 599-607 (1989))、③タバコから単離したキチナーゼ遺伝子をタバコ、ニンジン、ヒマワリ、トマト、トウモロコシ、カモガヤに導入したもの (特開平 3-35783号公報、特開平 3-112486号公報)、④マメ類のアラチス・ハイボガエア (*Arachis hypogaea*) から単離したキチナーゼ遺伝子をタバコに導入したもの (特開平 5-76873号公報)、⑤トマトから単離したキチナーゼ遺伝子をトウモロコシ、ダイズ、ビート、コムギ、オオムギ、ケ

シ、アブラナ、ヒマワリ、アルファルファ、バラ、カーネーション、ガーベラ、トマト、ニンジン、レタス、チコリ、メロン、キャベツ、タバコへ導入したもの (特開平 6-38762号公報)、⑥イネから単離したキチナーゼ遺伝子をイネに導入したもの (Bio/Technology 13: 686-691 (1995))、⑦リゾプス・オリゴスポラス (*Rhizopus oligosporus*) から単離したキチナーゼ遺伝子をエレクトロポレーション法により、ペンドグラスに導入したもの (特開平8-172957号公報) 等が知られている。しかしながら、イネ以外の生物由来のキチナーゼ遺伝子を導入した遺伝子導入イネは未だに知られていない。

【0005】イネ科植物であるイネに外来遺伝子を導入した例として①レポーター遺伝子である $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子の導入による形質転換イネの作出 (Plant Cell Reporter 12: 1-6 (1993))、②イネの懸濁培養細胞にピアラフォス耐性遺伝子をパーティクルガン法により導入したピアラフォス耐性イネの作出 (Bio/Technology 13: 919-923 (1994))、③アグロストチス属植物のプロトプラストにハイグロマイシン耐性遺伝子をエレクトロポレーションにより導入し、このプロトプラストを固体培地に包埋しその培地の切片を別の固体培地にプレーティングして培養することによる、ハイグロマイシン耐性植物の作出 (特開平 2-5857号公報) 等が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、イネ科植物の形質転換植物を得るためのこれらの方法は、外来遺伝子を保持する形質転換植物体を確実に得るためには必ずしも効率が高いとは言えない。したがって、キチナーゼ遺伝子が導入されたイネが効率よく得られる方法の開発が望まれている。

【0007】本発明は、耐病性イネを得るために、上記問題点を解決し、キチナーゼ遺伝子が導入されたイネを効率よく作出する方法およびこの方法により作出されたキチナーゼ遺伝子導入イネを提供することを課題とする。

【0008】

【発明を解決するための手段】本発明者らは、このような課題を解決すべく鋭意検討した。その結果、選抜マーカーとしてイネ科植物で強いプロモーター活性を示すトウモロコシのユビキチンプロモーターに連結したハイグロマイシン抵抗性遺伝子を用いることおよび完熟イネ種子の胚盤細胞に由来するカルスの培養細胞にパーティクルガン法により遺伝子を導入すること等の工夫により、キチナーゼ遺伝子が導入された形質転換細胞が効率よく得られ、これを再生することによりキチナーゼ遺伝子導入イネが確実に得られることを見出し、本発明を完成した。

【0009】即ち、本発明は、イネに外来性キチナーゼ遺伝子を導入することを特徴とする遺伝子導入イネの作

出方法である。また、本発明は、上記方法により作出されるイネである。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の遺伝子導入イネの作出方法、及び該方法により作出されたイネについて詳細に説明する。

#### 【0011】1) 本発明のイネの作出方法

本発明のイネは、外来性キチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAを構築し、該DNAをイネに導入することにより作出することができる。

#### 【0012】① 組換えDNAの構築

外来性キチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAは、外来性キチナーゼ遺伝子を適当なベクターに挿入することにより構築することができる。本発明で用いるキチナーゼ遺伝子とは、キチンを構成成分であるN-アセチルグルコサミンのβ-グルコシド結合を加水分解する酵素であるキチナーゼをコードする遺伝子である。キチナーゼには、エキソ型およびエンド型のキチナーゼが知られているが、本発明にはいずれの型のキチナーゼをコードする遺伝子も使用できる。また、外来性とは、イネ以外の生物に由来するという意味である。

【0013】本発明に使用し得るキチナーゼ遺伝子は、糸状菌由来のものであっても、植物由来のものであっても、その他の生物由来のものであってもよい。糸状菌におけるキチナーゼの生理的機能については未だ解明されるに至っていないが、植物病原菌アスペルギルス・ニダランス (*Aspergillus nidulans*) では細胞壁分画にキチナーゼ活性が検出されること、また、ムコル・ムケド (*Mucor mucedo*) 等ではキチナーゼがキチン合成酵素と同様に膜分画に不活性型として存在すること等から、糸状菌の持っているキチナーゼは、自身の細胞壁中のキチンを分解するための役割をになっているものと考えられる(特開平 6-46849号公報)。また、植物もキチナーゼを有しており、これが病原菌に対する防御機構として機能していると考えられており、植物由来のキチナーゼ遺伝子も有効であると考えられる。いずれにしても、イネに導入したときに植物病原菌の感染・増殖を阻害することができるものであれば本発明に好適に用いることができる。

【0014】具体的には、セラチア・マルセセンスから単離されたキチナーゼ遺伝子 (*chiA*, *chiB*) (The EMBO J. 5: 467-473 (1986))、分裂酵母サッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*) から単離されたキチナーゼ遺伝子 (*CHS1*, *CHS2*) (Cell 46: 213-225 (1989))、糸状菌リゾプス・オリゴスポラスから単離されたキチナーゼ遺伝子 (*chi1*, *chi2*) (J. Bacteriol. 17: 7398-7406 (1992)、特開平 6-46849号公報) リゾプス・ニヴェウス (*Rhizopus niveus*) から単離されたキチナーゼ遺伝子 (*chi1*, *chi2*, *chi3*, *chi4*) (特開平 6-46849号公報)、インゲンマメのキチナーゼ遺伝子

(Pro. Natl. Acad. Sci. 83: 6820-6824 (1986))、キュウリのキチナーゼ遺伝子 (Pro. Natl. Acad. Sci. 86: 896-900 (1989))、バレイシヨのキチナーゼ遺伝子 (Nucleic Acids Res. 16: 5210 (1988)) 等が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、キチナーゼ分解活性を有する酵素タンパク質をコードする遺伝子であれば特に制限されない。上記キチナーゼ遺伝子の中でも好ましいものとしては、リゾプス・オリゴスポラスから単離されたキチナーゼ遺伝子、又はリゾプス・ニヴェウスから単離されたキチナーゼ遺伝子を例示することができる。リゾプス・オリゴスポラスは少なくとも2種類のキチナーゼを、リゾプス・ニヴェウスは少なくとも4種類のキチナーゼを産生することが知られている (J. Bacteriol. 74: 7398-7406 (1992)、特開平 6-46849号公報) が、これらをコードする遺伝子のいずれも使用できる。また、これらのキチナーゼ遺伝子産物は、プレプロ構造をなしており、小胞体膜の通過の際にプレ配列であるシグナル配列が切断され、その後さらにC末端領域にあるプロ配列が切断されて活性型のキチナーゼになることが知られている。本発明には、プレ配列およびプロ配列を有するキチナーゼ遺伝子全体のほか、プレ配列だけが除去された前駆体型あるいはプレ配列および配列の両方が除去された活性型の酵素をコードする遺伝子のいずれも使用できる。さらに、これらの遺伝子は、イントロン配列を含んでいるが、イネへの導入に先立ってこのイントロンを除去しておくことが好ましい。

【0015】上記のキチナーゼ遺伝子固有のプロモーター等が、イネの細胞内でうまく機能しない場合には、これらの遺伝子がイネで発現するようにイネの細胞中で機能するプロモーターをキチナーゼ遺伝子上流に配し、さらに、ターミネーターを下流に配するように構築して、ベクターDNAに組み込む。本発明で利用するプロモーターとしては、植物体中で機能することが知られているものであれば特に限定されず、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35Sプロモーター (The EMBO J. 6:3901-3907 (1987))、トウモロコシのユビキチン (PlantMol. Biol. 18: 675-689 (1992)) のプロモーターなどを挙げることができるが、これらの中でもトウモロコシのユビキチンのプロモーターを最も好ましいプロモーターとして例示できる。ターミネーター配列としては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス由来やノバリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等が挙げられるが、植物体中で機能することが知られているものであればこれらのものに限定されない。また、必要に応じてプロモーター配列とキチナーゼ遺伝子の間に、キチナーゼ遺伝子の発現を増強させる機能を持つイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ (*Adh 1*) のイントロン配列 (Genes & Development 1: 1183-1200 (1987)) を導入することができる。

【0016】キチナーゼ遺伝子が導入されたイネ細胞

は、キチナーゼ遺伝子あるいはその発現産物の解析により、キチナーゼ遺伝子を保持する形質転換細胞を選択することも可能であるが、より効率的に目的の形質転換細胞を選択するためには、キチナーゼ遺伝子と共に有効な選抜マーカー遺伝子を含む組換えDNAを構築するか、あるいは、キチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAとは別個に有効な選抜マーカー遺伝子を含む組換えDNAを構築するのが好ましい。ここで使用する選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するHygromycin phospho-transferase (hp t) 遺伝子、ピアラフォス (bialaphos) に対する抵抗性を付与する Phosphinothricin acetyl transferase (bar) 遺伝子等を例示することができ、これらの遺伝子は、単一で用いてもよく、複数組み合わせ用いてもよい。

【0017】上記のキチナーゼ遺伝子および必要に応じてマーカー遺伝子を、イネの細胞に導入するために、これらの遺伝子をベクターに挿入した組換えDNAを構築する。ここで使用するベクターとしては、市販の pUC 19 などの pUC系ベクター等が挙げられる。

#### 【0018】② 組換えDNAのイネへの導入

上記の組換えDNAをイネへ導入することにより、キチナーゼ遺伝子導入イネを作出することができる。本発明に用いるイネとは、主にOryza 属に含まれるイネの栽培品種を指すが、これに限定されるものではない。その代表的な栽培品種としては、コシヒカリ等の日本型品種および IR36 等のインド型品種があるが、これらに限定されるものではない。組換えDNAを導入する方法としては、エクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法などを例示することができるが、これらの中でもパーティクルガン法が好ましい。組換えDNAの導入対象は、上記導入方法に応じて決めればよく、例えば、プロトプラスト、カルス細胞などを挙げることができるが、これらの中でも胚様体カルスの分裂細胞が好ましく、胚盤由来の胚様体カルスの分裂細胞が特に好ましい。

【0019】以下、キチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAをイネの胚盤由来の胚様体カルスの分裂細胞にパーティクルガン法を用いて導入し、植物体までに再分化させる方法について説明する。

【0020】まず、イネの完熟種子から胚盤由来の胚様体カルスを誘導する。即ち、イネの完熟種子を消毒した後、適当な培地で培養し、カルスを誘導し、得られたカルスの中から胚盤組織より生じたカルスをのみを別の培地に移植し、この培地で一定期間培養することにより胚様体カルスを得る。ここで、消毒は、次亜塩素酸などを使用し、常法に従って行うことができる。最初に使用する培地は、完熟種子からカルスを誘導できるものであればどのようなものでもよく、例えば、2, 4-ジクロロ酢酸を含むNC2寒天固形培地などを使用することができる。この培地では、1～2週間程度培養する。移植後に

使用する培地は、胚様体カルスを誘導できるものであればどのようなものでもよく、例えば、AA寒天固形培地を使用することができる。この培地では1～2週間程度培養する。

【0021】次に、得られた胚様体カルスへパーティクルガン法によりキチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAを導入する。パーティクルガン法による遺伝子導入は、選抜マーカー遺伝子を含むベクターとキチナーゼを含有するベクターとを混合して同時にイネの細胞に撃ち込むいわゆる co-transformation法により行うのが好ましい。具体的には、以下のようにして行う。胚様体カルスをNP培地上の濾紙に移し、約4時間後にキチナーゼ遺伝子を含む組換えDNAとマーカー遺伝子を含む組換えDNAとを金属粒子に付着させ、胚様体カルスへ打ち込む。

【0022】マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を使用した場合、形質転換細胞の選抜は、遺伝子導入処理を行った細胞を当該薬剤を含む培地中で培養することにより行うことができる。培養期間は、9～10週間程度とするのが好ましい。

【0023】選抜された形質転換細胞は、再分化誘導用培地で培養した後、順化用培地で培養して発根させ、イネ植物体へ誘導する。再分化誘導用培地としては、例えば、NH-50 寒天固形培地を用いることができ、この培地には、マーカー遺伝子に対応する薬剤を添加しておくことが好ましい。順化用培地としては、例えば、1/2 N6培地 + 0.05 mg/L ナフタレン酢酸 (NAA)、及び0.25 %ゲランガムを含む固形培地を使用することができる。再分化誘導培地での培養条件は、温度は15～30℃、好ましくは20～25℃、光条件は、1日あたり 500～2,000 ルクス、好ましくは800～1,000 ルクス、培養期間は、20～60日間、好ましくは30～40日間とするのが適当である。得られたイネ植物体は、土壌またはバーミキュライトを積めたポットで栽培し、株分けすることにより、増殖させることができる。このようにして増殖されたキチナーゼ遺伝子導入イネも、本発明の範囲に含まれる。

【0024】上記で得られた形質転換細胞塊 (カルス) およびその再分化植物体に目的とするキチナーゼ遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞および組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法もしくはサザン法を用いて導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。

#### 【0025】2) 本発明のイネ

本発明の遺伝子導入イネは、上記の方法により作出することができる。本発明の遺伝子導入イネとは、上記方法により得られたイネ植物体のみならず、この植物体から得られる栄養増殖物および種子等も含む概念である。本発明の遺伝子導入イネは、糸状菌が原因となる各種植物病害などを含むストレスに耐性を有することが期待される。

【0026】

【実施例】以下に、本発明の実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0027】(1) リゾプス・オリゴスポラス由来のキチナーゼ遺伝子(chi 1)を含む組換えDNAの構築  
キチナーゼ遺伝子として、プラスミド pCHIM2 (特開平6-46849号公報)に含まれるリゾプス・オリゴスポラス由来のキチナーゼ遺伝子(chi 1)を用いた。このプラスミドは、chi 1 の成熟型酵素をコードするDNA配列 (イントロンは除去されている) を含んでおり、開始コ

ドンの上流および終止コドンの下流に制限酵素 HindIII 部位を有している。なお、pCHIM2を保持する大腸菌の形質転換体は、FERM P-13061の受託番号で、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(寄託日平成4年7月10日)。  
【0028】プラスミド pCHIM2 の 10 ngを制限酵素 HindIII の 10 unitで消化した後、断片を低融点アガロースゲル電気泳動により分画し、約 1.3 kb のバンドをアガロースゲルから切り出した。このゲルの切片にTEバッファ (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) を当量加え、68℃、20分間でアガロースゲルを溶解後、飽和フェノール抽出を2回行うことによりアガロースを除いた。この抽出液に 100分の1容の3 M酢酸ナトリウム、2 倍容のエタノールを加え、-20℃に6時間放置した。この溶液を 1,500 rpm、4℃で10分間遠心分離し、得られた沈殿を減圧下で乾燥させ、10 mL のTEバッファに溶解することにより1.3 kbの chi 1 遺伝子を含むDNA断片を得た。

【0029】一方、イネ科植物において高い遺伝子発現を誘導することが知られているトウモロコシのユビキチンプロモーターを含むプラスミドベクター pAHC17 (Plant Mol. Biol. 18:675-689(1992)) の 10 mgのDNAをTEバッファ (宝酒造(株)製) 中で 10 unitずつの制限酵素 Sma Iで消化した後、DNAを沈殿・乾燥させ、5 mL のTEバッファに溶解した。

【0030】上記のようにして得られた chi 1遺伝子を含むDNA断片とpAHC17のDNA断片の末端をそれぞれ DNA Blunting kit (Takara Co.)を用いて平滑化した。平滑化した各DNA断片の 5 mLずつを混合し、DNA ligation kit (Takara Co.)により連結させた。この連結反応液のうちの 10 mLを市販の大腸菌コンピテントセル JM109 (Takara Co.) 100 mLと混合し氷中で 30 分間、42℃で 45 秒間、さらに氷中に1分間放置した。このようにして得た大腸菌の形質転換体を含む溶液に、LB培地 (1% Bacto trypton, 0.5% Bact yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1%グルコース pH 7.5) 100 mLを加えて、37℃で1時間培養した後、カナマイシン 50 mg/L、0.2 mM IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)、X-Gal (5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド) 40mg/Lを含有する LB

寒天培地にプレーティングした。翌日、培地上に出現したコロニーのうち白色のコロニーの中から1つを選抜し、カナマイシンを含むLB液体培地で 37℃で約 6~12時間振盪培養した。この培養液から Wizard DNA Mini prep kit (Promega Co.)を用いてプラスミドを調製し、各種の制限酵素を用いて消化してアガロースゲル電気泳動により解析を行うことにより、トウモロコシのユビキチンプロモーターの下流に chi 1遺伝子が正常に連結されているプラスミドを選択し、これを植物導入用組換えベクター pUbi-CHI (図2参照)とした。

【0031】また、この組換えベクターと共に導入する選抜マーカー遺伝子を含む組換えベクターとして、トウモロコシのユビキチンプロモーターに hpt遺伝子を連結したベクター pUHP を構築した(図1参照)。

【0032】(2) イネの胚様体カルスへの pUbi-CHI の導入

#### ①イネの胚様体カルスの誘導

水稻 (*Oryza sativa* L. varササニシキ) の完熟種子を 1%次亜塩素酸で消毒後、NC2培地 (N6培地 + 2 mg/L 2, 4-ジクロロ酢酸 (2, 4-D)、0.9% 寒天固形培地) に置床して培養した。3週間後、胚盤組織より生じたカルスをAA培地 (Muller et al. 1978) 0.9% 寒天固形培地に移植して 1~2 週間培養するとパーティクルガン法に供試可能な胚様体カルスが得られた。

【0033】②組換えベクター pUbi-CHI の導入  
胚様体カルスをNP培地 (N6培地 + 1 mg/L 2, 4-D、3.6% Sorbitol、3.6% Mannitol)上の濾紙に移し、約4時間後にパーティクルガン法 (Rehbock C. M. Model 260) に供試した。遺伝子導入は、1回当たり 2 mg の組換えDNA (キチナーゼ遺伝子を含む pUbi-CHI プラスミッドと選抜マーカーのハイグロマイシン抵抗性遺伝子を含む pUHP プラスミッドを 6:1の割合で混合した) 1 mg の金微粒子に付着させて 150 kg/cm<sup>2</sup> の圧搾空気 で金粒子を加速してカルスに撃ち込んだ。

#### 【0034】③形質転換細胞の選抜

導入 16 時間後のカルス細胞を NH-30培地 (N6培地 + 1 mg/L 2, 4-D、25 mg/Lハイグロマイシン、0.9%寒天固形培地)に移し、2週間後にカルス上の増殖細胞塊 (1mm)を選抜した。

#### 【0035】④植物体への再生

上記で得られた直径4~6mmの大きさのハイグロマイシン耐性カルスを NH-50培地 (N6培地 + 1 mg/L 2, 4-D、50 mg/L ビアラフォス、0.9%寒天固形培地) に置床し、2回目の選抜にかけた。次いで、増殖したカルスは、N1培地 (N6培地 + 3% ソルビトール、1 mg/Lアブシジン酸 (ABA)、1%寒天固形培地) に移植して再分化を誘導した。再分化したシュートは、順化用培地 (1/2 N6培地 + 0.05 mg/L ナフタレン酢酸 (NAA)、0.25%ゲランガム固形培地) に移植した。

【0036】上記の方法により、キチナーゼ遺伝子を導

入したイネの胚様体カルスに由来する 73 個体の再分化植物体を得た。このすべての系統は、稔性が認められ自殖種子を採取することができた。

#### 【0037】(3) 形質転換植物の遺伝子解析

##### ①キチナーゼ遺伝子を保持する植物体の選抜

再分化したイネの自殖種子 20 粒をバーミキュライト中に播種し、2 週間後に幼植物体を採取した。この幼植物体の約 0.5 g を液体窒素で凍結、粉碎後 ISOPLANT (ニッポンジーン (株) 製) を用いてゲノム DNA を抽出した。

【0038】上記で得られた約 200 ng の DNA をテンプレートとして PCR を行い、導入した遺伝子配列の増幅を試みた。PCR 条件は、PCR Amplification kit (Takara Co.) に従っておこなった。具体的には、10mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.01% ゼラチン、pH 8.3、dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 各 2.5 mM Mixture, Ex-Taq DNA polymerase 1.25 unit およびプライマー 2 種類 (それぞれ配列番号 1、2 に示す配列を有するオリゴヌクレオチド) 各 2 mM を混合して反応液を調製した。反応液 25 μl を DNA Engine PTC-200 (MJ Research 社製) を用いて、95°C-1分、60°C-1分、72°C-1.5分の温度条件を 30 回繰り返して増幅反応を行った。

【0039】PCR 産物を常法に従い 1.2% アガロースゲル電気泳動法で分析したところ、1.2 kb の増幅された DNA バンドが確認された。このバンドパターンより再生植物個体より得られた 73 系統のうち 24 系統にキチナーゼ遺伝子が組み込まれていることが確認された (表 1)。

【0040】②導入キチナーゼ遺伝子産物の解析  
キチナーゼ遺伝子導入イネにおいて、導入遺伝子にコードされているキチナーゼが産生されていることを確認するため、以下の操作を行った。

【0041】上記の組換えイネ植物体の葉を 0.5 g 採取し、液体窒素を用いて粉碎した。この粉末を 2 ml の抽出用バッファー (0.1 M K-PO<sub>4</sub>, 0.1 mM PMSF, pH 6.5) で磨砕して、磨砕物を微量小型超遠心分離機 CS120 (Hitachi Co.) を用いて 120,000 g で 22 分間遠心し、得られる上清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法のサンプルとした。

【0042】SDS-電気泳動法は、Laemmli (1970) の方法に準じて 12.5 % のポリアクリルアミドゲルを充填した平板ゲルを用いて行った。タンパク質の分子量の推定は、分子量マーカー III (第一化学薬品 (株) 製) を同時に泳動して行った。SDS-電気泳動法により分離されたタンパク質は、セミドライプロット装置を用いて電気泳動的に PVDF 膜に転写した。SDS-ゲルのタンパク質染色は、常法に従いクマシーブルーを用いて行った。この結果を図 3 (a) に示す。図中、レーン 1 はマーカー、レーン 2 は非形質転換体、レーン 3~12 は形質転換体 (T

1) を示す。

【0043】次に、導入したキチナーゼ遺伝子産物を検出するために、キチナーゼのアミノ酸配列に基づき 2 本の合成ペプチド (それぞれ配列番号 3、4 に示す配列を有するペプチド) を作製し、これをウサギに免疫してペプチド抗体を調製した。

【0044】上記の転写した PVDF メンブレンは、10 % スキムミルクを溶解した PBS バッファー (10 mM K-PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.5) に浸漬し、タンパク質との結合を飽和させた後、PBS バッファーで 1,000 倍希釈したキチナーゼのペプチド抗体とインキュベートした。メンブレンを洗浄後、2 次抗体としてアルカリフォスファターゼを結合させた抗ウサギ IgG 抗体 (0.15 unit / mL) と反応させた。メンブレンを PBS バッファーで洗浄した後、アルカリフォスファターゼ活性の検出は、NBT および BCIP を基質として用いた。この結果を図 3 (b) に示す。

【0045】この図が示すように、10 個体の再分化植物体のうち、4 個体において導入キチナーゼ遺伝子の産物として期待される分子量 42 kDa のタンパク質が合成ペプチド抗体と陽性反応することが認められた。また、この合成ペプチド抗体は、分子量 30 kDa のイネのキチナーゼとも陽性反応を示した。

【0046】③キチナーゼ遺伝子導入イネ組換え体の耐病性の検討

上記で得られたキチナーゼ遺伝子導入イネの自殖後代をセルトレーにそれぞれ 1 本ずつ植えて、いもち菌に対する耐病性試験を行った。いもち病菌 (長 69-150: レース 007) を水稻品種「かけはし」に噴霧接種し、生じた病斑より再分離したいもち病菌を用いた。常法によりいもち病菌をオートミール培地で培養し、菌糸を洗浄後、BLB ランプを 5 日間照射して孢子を形成させて収集した。

【0047】自動開閉式発病装置 (梅谷鉄工所製) を使用し、孢子懸濁液 200 μl (孢子濃度 1 × 10<sup>6</sup> 個/μl) を検定植物体に噴霧接種し、温室に 24 時間放置した。その後、温室内で栽培し、接種 8 日後に病斑を調査した。各キチナーゼ遺伝子導入イネの 8 個体由来する自殖後代系統についてもいもち病菌孢子散布による罹病度の調査結果を表 1 に示した。

【0048】供試した自殖後代系統は、導入キチナーゼ遺伝子について分離するために、キチナーゼ遺伝子を持つ系統と持たない系統が含まれており、まだ、正確な耐病性検定をすることはできないが、コントロールの非形質転換体に比較していもち病斑の程度が軽い個体が多く含まれている系統が認められているので、キチナーゼ導入イネにいもち病に対する抵抗性が付与されているものと期待できる。

【0049】

【表 1】 キチナーゼ遺伝子導入イネ後代のいもち病菌孢子接種実験

系統 C	検定個体数	A	B
非形質転換体	20	1	
6 13			
UC019	15	3	3 9
UC028	11	2	4 5
UC086	13	4	2 7
UC105	14	2	1 11
UC121	15	3	3 9
UC122	11	3	3 5

## 【0050】

A: 全く病斑がないか、あってもわずかなもの

B: 葉の一部に進展性病斑が見られるもの

C: 数枚の葉に進展性病斑が見られるか葉が枯死しているもの

## 【0051】

【発明の効果】本発明によれば、キチナーゼ遺伝子を導入したイネを効率良く作出することがきる。また、遺伝子導入に際し、パーティクルガン法を用いれば、作出した遺伝子導入イネの種子稔性は非常に高くなる。本発明によって作出されるキチナーゼ遺伝子導入イネは、いもち病等の各種病害に対して抵抗性を有する。

## 【0052】

## 【配列表】

## 配列番号1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

アンチセンス: NO

## 配列

His Val Phe Asn Val Gly Gly Thr Pro Glu Ile Asn Leu Ser Ser 15

## 【0055】配列番号4

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

## 配列

Asp Ile Lys Lys Cys Gln Asp Lys Gly  
Val Lys Val Ile Leu Ser 15

## 【図面の簡単な説明】

【図1】pUHPプラスミッドの構造の模式図。

【図2】pUbi-CHIプラスミッドの構造の模式図。

\* 配列の種類: トウモロコシのユビキチンプロモーターのDNA配列の一部

## 配列

CCCTGCCTTC ATACGCTATT 20

## 【0053】配列番号2

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

アンチセンス: YES

配列の種類: ノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターのDNA配列の一部

## 配列

TAATCATCGC AAGACCGGCA 20

## 【0054】配列番号3

配列の長さ: 15

30 配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

\* 配列の種類: キチナーゼのアミノ酸配列の一部

※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

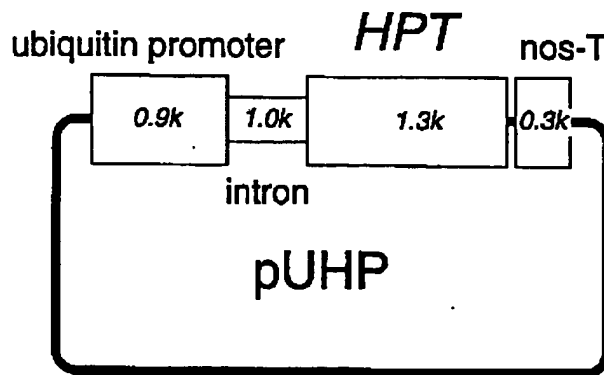
※ 配列の種類: キチナーゼのアミノ酸配列の一部

★【図3】遺伝子導入イネから抽出したタンパク質のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動写真

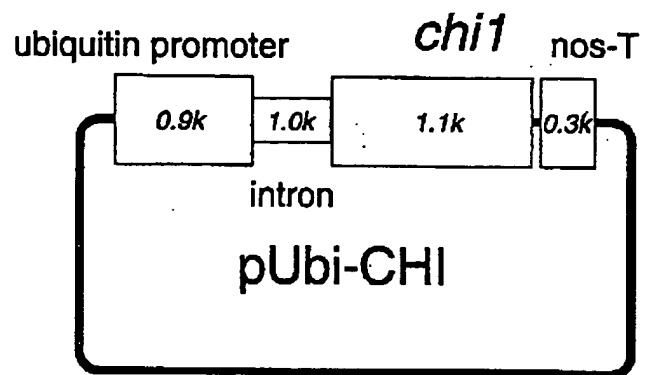
★



【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成9年4月16日

【補正方法】変更

【手続補正3】

【補正内容】

【補正対象書類名】図面

【図3】

【補正対象項目名】図3

## 図面代用写真

